

# TRABAJOS ORIGINALES

## ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS ACUOSOS DE GRANADA (*Punica granatum* L.) FRENTE A *Shigella*

### ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF AQUEOUS EXTRACTS FROM POMEGRANATE (*Punica granatum* L.) AGAINST *Shigella*

Ruiz Parra VI<sup>1</sup>, Gaudioso C<sup>1</sup>, Cecilia M<sup>1</sup>, Porcel N<sup>1</sup>, Silva C<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bacteriología, Dr. Luis C. Verna. Instituto de Microbiología, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, UNT. Ayacucho 491 2° Piso. T4000INI. SM de Tucumán, Tucumán, Argentina. Tel. 54-(0)381-4247752 Ext 7013.

\* Autor correspondiente: Clara Silva. E-mail: csilva@unsta.edu.ar

#### RESUMEN

La diarrea causada por enteropatógenos es una importante causa de enfermedad en los niños en América Latina. El incremento de la resistencia de *Shigella* frente a antibióticos en varios lugares del mundo, incentiva la búsqueda de terapias alternativas. Entre estas últimas se encuentra el uso de sustancias naturales antimicrobianas. En este trabajo se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* de extractos acuosos de cáscara de granada (*Punica granatum* L.) frente a aislamientos clínicos de *Shigella* sp. para determinar los siguientes parámetros: halos de inhibición por difusión en agar, concentración inhibitoria mínima (CIM), concentración bactericida mínima (CBM) y actividad bactericida (curva de muerte). El análisis fitoquímico reveló la presencia de metabolitos secundarios en la cáscara, incluyendo compuestos fenólicos y flavonoides. El extracto acuoso de cáscara de granada obtenido por decocción mostró mayor inhibición frente a *Shigella flexneri* que aquel obtenido por infusión. Entre las decocciones, las de 25-30 min de ebullición fueron las de mayor actividad.

La curva de muerte disminuyó tres unidades logarítmicas después de 4 h, indicando un efecto bactericida, las microfotografías demostraron la pérdida de la integridad de la pared celular. La actividad del extracto acuoso estaría relacionada a un mayor contenido (46%) de compuestos fenólicos totales.

PALABRAS CLAVE: efecto antimicrobiano, granada, *Shigella*

#### SUMMARY

The diarrhea caused by enteropathogens is prevalent in children from Latin America. The increasing number of reports on antibiotic resistance of *Shigella* in several parts of the world encourages the search of alternative therapies, including the use of natural antimicrobials. The current research assessed the *in vitro* antimicrobial activity of aqueous extracts from the peel of pomegranate (*Punica granatum* L.) against clinical isolates of *Shigella* on the following parameters: halo of growth inhibition, minimum inhibitory concentration (MIC), minimal bactericidal concentration (MBC) and

bactericidal activity (death curve). Phytochemical analysis revealed the presence of secondary metabolites in the peel, including phenolic compounds and flavonoids. The aqueous extract obtained by decoction from the pomegranate peel inhibited *S. flexneri* more than the infusion. The decoctions obtaining after boiling for 25-30 min showed the highest antibacterial activity. The death curve decreased 3 log units after 4 h, indicating a bactericidal effect, and photomicrographs showed the loss of cell wall integrity. AE activity was related to a higher content (46%) of total phenolic compounds.

**KEY WORDS:** antimicrobial effect, pomegranate, *Shigella*

## INTRODUCCIÓN

La shigelosis es un problema endémico en nuestro medio, reconocido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como uno de los más importantes riesgos en Salud Pública. Es una de las causas principales de diarrea en pacientes pediátricos en los países en desarrollo y en menor grado en niños en los países industrializados. El riesgo de contraer shigelosis está asociado a las deficiencias en la sanidad ambiental y la higiene personal [1,2]. La shigelosis, es una disentería aguda ocasionada por bacilos del género *Shigella* que se manifiesta con la presencia de heces con sangre, mucus, acompañada de fiebre, calambres abdominales y tenesmo. La mayoría de los países de América Latina presentan zonas de alto hacinamiento con un saneamiento deficiente. La diarrea y disentería causadas por enteropatógenos bacterianos se encuentran entre las principales causas de morbi-

dad y mortalidad [3,4]. Esta enfermedad endémica es responsable del 8 al 12% de los episodios de diarrea y el 52% de los casos requieren internación. La mayor tasa de incidencia se ha registrado en niños entre 1 y 4 años de edad. Se han reportado al menos 140 millones de casos en todo el mundo con 600.000 muertes por año de las cuales el 60% corresponden a niños menores de 5 años de edad [5]. Es una de las pocas infecciones entéricas para las cuales se prescriben antimicrobianos con el fin de disminuir la duración de la diarrea y la excreción de *Shigella* en las deposiciones obteniéndose así beneficios clínicos y epidemiológicos.

En colaboración con WHONET - Argentina, la red nacional de vigilancia de la resistencia antimicrobiana, y el Instituto "Dr. Carlos Malbrán" (Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud, ANLIS) organizamos un sistema para la detección de brotes locales y regionales de *Shigella* spp. El procedimiento incluía la búsqueda de brotes determinando el género, la especie y el fenotipo de resistencia de la bacteria responsable. En un período de 12 meses se identificaron 19 "eventos" estadísticos. Seis brotes fueron reportados al Ministerio de Salud, cuatro de ellos estaban estrechamente ligados con eventos detectados por SaTScan [6,7]. El incremento en el nivel de resistencia de bacterias enteropatógenas, ante los agentes antimicrobianos es alarmante y el tratamiento de las enfermedades causadas por estos patógenos se hace cada vez más difícil. En nuestro laboratorio se evaluó la sensibilidad de enteropatógenos frente a antimicrobianos. Los primeros se aislaron de 4.364 niños menores de cinco años de edad afectados por la diarrea. Los pacientes sufrían

de diarrea aguda y vivían en siete ciudades diferentes en la provincia de Tucumán (Argentina). La resistencia de *Escherichia coli* diarreagénica a ampicilina fue del 74,5% y a trimetoprima-sulfametoxazol del 64,2% mientras que la resistencia de *Shigella* spp. fue del 62% y 75,6%, respectivamente. Sin embargo, la resistencia no siempre se distribuye de manera uniforme y la Argentina también presenta variaciones geográficas [6,7]. La difusión mundial de patógenos resistentes a los antibióticos ha incrementado la búsqueda de compuestos antimicrobianos de origen natural, incluyendo las plantas medicinales. Se sabe que en algunos países en desarrollo, las plantas son ampliamente utilizadas con fines terapéuticos para tratar enfermedades infecciosas. Entre los distintos compuestos vegetales, los polifenoles han recibido una atención especial debido a sus variadas funciones biológicas. Poco se sabe acerca de la actividad antibacteriana y de los efectos farmacológicos de estos compuestos frente a enterobacterias, que producen diarrea y disentería. De ahí la necesidad de investigar las propiedades de las plantas medicinales para validar su uso en la medicina tradicional [8,9]. En estudios previos se determinó la actividad antimicrobiana de extractos acuosos (EA) de arbustos y plantas populares en el noroeste argentino tales como la agrimonia, cachiyuyo o charrúa (*Aristolochia argentina*), duraznillo blanco (*Solanum glaucophyllum*), encina (*Quercus ilex*), granada (*Punica granatum*), guayaba (*Psidium guayaba*), Hamamelis (*Hamamelis virginia*), el higo común (*Ficus carica*), pétalos de rosa (*Rosa* spp.), roble (*Quercus robur*), suico (*Tagetes minuta*) y zarzamora (*Rubus* spp.) contra enteropatógenos y se demostró que los EA de

encina, cáscara de granada, hamamelis, pétalos de rosa y roble inhibieron cepas de *Shigella*. El EA obtenido de cáscara de granada mostró el mayor halo de inhibición [10,11]. Investigando la actividad antibacteriana *in vitro* de varios extractos, Prashanth y col. [12] establecieron la concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto acuoso de *Punica granatum* L. frente a los patógenos *Staphylococcus aureus* (25 mg/mL), *E. coli* (50 mg/mL), *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis* (25 mg/mL) y *Salmonella typhi* (25 mg/mL). Estudiando las propiedades antibacterianas de extractos acuosos y metanólicos obtenidos de 26 plantas medicinales utilizadas en México para el tratamiento de trastornos gastrointestinales, Alanís y col. [13] ensayaron *Punica granatum* L. frente a *S. sonnei*, *S. flexneri* y *Salmonella* spp. Un extracto crudo acuoso inhibió el 64% de las cepas *S. sonnei*, mientras que el mismo extracto con la misma concentración del compuesto activo (8 mg/mL) inhibió el 100% de las cepas *S. flexneri*. Estudios llevados a cabo en Uruguay, Paraguay y Argentina han demostrado que *S. flexneri* es la especie más frecuentemente aislada durante los episodios de diarrea, seguida por *S. sonnei* [14,15]. Teniendo en cuenta que en San Miguel de Tucumán, Argentina, *Shigella* es la segunda enterobacteria encontrada en los episodios de diarrea y que el uso de las hierbas medicinales es muy común en nuestra población, el objetivo de esta investigación fue demostrar la actividad antimicrobiana de extractos acuosos obtenidos a partir de cáscara de granada frente a una cepa de *S. flexneri*. En el año 2001 Prashanth y col. [12] estudiaron la actividad antibacteriana *in vitro* de varios extractos y los valores CIM (mg/mL) del extracto acuoso de *Punica*

*granatum* L. para los diferentes patógenos fueron los siguientes: *S. aureus* (25), *E. coli* (50), *Klebsiella pneumoniae* (sin actividad), *P. vulgaris*, *B. subtilis* (25) y *S. typhi* (25). En el año 2005 Alanis y col. [13] estudiaron las propiedades antibacterianas de extractos acuosos y metanólicos obtenidos a partir de 26 plantas medicinales utilizadas en México para el tratamiento de trastornos gastrointestinales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

La cáscara de granada se obtuvo de una herboristería ubicada en San Miguel de Tucumán, Argentina. Los extractos se prepararon siguiendo dos formas extractivas descriptas en Farmacopea Argentina VII.

Infusión: 4 g de material vegetal se sumergieron en agua hirviendo (100 mL) durante 10 min para saturar el líquido con los compuestos activos presentes en la planta. Después de enfriar hasta 40-45°C, se filtró el líquido y se liofilizó el filtrado.

Decocción: se hirvió 4 g de material con 100 mL de agua durante 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 min. Después de enfriar hasta 40-45°C, se filtró el líquido y se liofilizó el filtrado.

### Microorganismos

Cepas de *S. flexneri* (n=7), *S. flexneri* resistente a la ampicilina (n=1) procedentes de pacientes internados en hospitales de Tucumán se ensayaron en presencia de los extractos acuosos de cáscara de granada con el fin de establecer la sensibilidad de las mismas. Todas las cepas fueron caracterizadas en el Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, UNT,

Tucumán, Argentina. Las cepas fueron identificadas mediante el análisis bioquímico estándar, según el Manual de Microbiología Clínica [17] y el Manual de Determinaciones Bacteriológicas de Bergey [18]. Las cepas fueron conservadas a -70°C en medio BHI con 25% (v/v) de glicerol. Las mismas se activaron mediante subcultivo en caldo BHI. De todas las cepas ensayadas, se seleccionó una de *S. flexneri* aislada de un niño de tres años con disentería bacilar, resistente a ampicilina, que demostró mayor sensibilidad a los extractos acuosos de cáscara de granada para posteriores ensayos antimicrobianos.

### Ensayos antibacterianos

Método de difusión en agar: se prepararon inóculos de las cepas a ensayar cuyo tamaño fue de  $10^8$  células/mL equivalente al 0,5 de la escala de McFarland [19]. Cada inóculo se diluyó 1/10 en caldo de Mueller Hinton (MHB).

A partir de cada dilución 1/10 se sembraron 2 µL ( $2 \times 10^4$  UFC/mL) en el centro de una caja de Petri conteniendo 15 mL de medio Mueller Hinton con agar al 1,5% (MHA) (Britania). Los 2 µL se distribuyeron uniformemente sobre la superficie del MHA utilizando un hisopo estéril. En cada caja de Petri, se perforaron pozos de 5 mm de diámetro en el agar con un sacabocados estéril. En cada pozo se vertieron 50 µL de un EA. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h.

Después de la incubación se examinaron las placas para determinar la inhibición del crecimiento bacteriano indicada por una zona sin crecimiento alrededor de los pozos. Se midió el tamaño de los halos de inhibición y la actividad antibacteriana fue expresada como el diámetro

(mm) de la zona de inhibición. La ausencia de un halo de inhibición fue interpretada como ausencia de actividad. Cada extracto se ensayó por triplicado y cada experimento se repitió dos veces.

### **Determinación de compuestos solubles en agua por liofilización**

Cincuenta mL de extracto de cáscara de granada al 4% después de decocción durante 10 min y posterior liofilización permitió obtener 10 mg de compuestos solubles por mL de EA (10 mg de compuesto soluble/mL EA).

### **Determinación cuantitativa de la actividad antimicrobiana**

Método de macrodilución seriada en agar: se realizaron diluciones seriadas (volumen final 1 mL) del EA con MHB. A cada dilución se le incorporó 9 mL de MHA fundido, la mezcla se vertió en placas de Petri y se mezcló cuidadosamente. Después de la solidificación, cada placa se sembró con 2  $\mu$ L de una suspensión de células bacterianas ( $2 \times 10^4$  bacterias/mL). Posteriormente, las placas de Petri se incubaron aeróbicamente a 37°C durante 24 h. Se incluyó un control de crecimiento de cada cepa en MHA sin EA. La CIM se definió como la mayor dilución del EA en la cual no se observó crecimiento después de incubación.

Método de microdilución en caldo: se utilizó para determinar los valores de CIM y CBM de los extractos frente a los organismos ensayados según lo recomendado por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio [19]. Diluciones del extracto entre 0,5 y 0,02 fueron ensayadas frente a una concentración de inóculo final de  $5 \times 10^5$  UFC/mL. Los tubos de ensayo inoculados se incubaron a 37 °C durante 24 h. La

presencia de turbidez en los tubos indicó la existencia de crecimiento bacteriano. El valor de la CIM correspondió al tubo conteniendo la más baja concentración de EA en la cual no se observó ninguna turbidez.

### **Determinación de la actividad bactericida del EA de cáscara de granada (CBM)**

La CBM se obtuvo por re-inoculación de placas de agar con 10  $\mu$ L procedentes de los tubos en los que no se observó turbidez en el ensayo de microdilución en caldo. La concentración bactericida mínima (CBM) se determinó después de 24 h de incubación a 37°C. La CBM se definió como la dilución más baja del EA que mató al menos el 99,9% de las bacterias.

### **Estudios de curvas de letalidad de *S. flexneri***

La actividad bactericida se determinó a través del método de la curva de letalidad recomendado por el CLSI. En el medio MHB se agregó una suspensión de *S. flexneri* de  $5 \times 10^5$  UFC/mL y EA para obtener una concentración final de dos veces la CIM. Las mezclas se incubaron a 37°C durante 12 h. Se tomaron muestras después de 0, 2, 4 y 6 h que fueron diluidas en serie. Cada dilución (0,1 mL) se sembró por duplicado. Se incubaron a 35°C durante 18 h y se realizó el recuento de células bacterianas totales (UFC/mL). La actividad bactericida se definió como una reducción del 99,9% ( $\geq 3$  unidades logarítmicas) en el recuento de células comparado con el recuento total de células del inóculo inicial. El efecto "carry over" fue minimizado por dilución. La incubación se prolongó por 24 h para ver si no se producía recrecimiento.

## ANÁLISIS FITOQUÍMICO

### determinación del contenido de los compuestos fenólicos y flavonoides totales

Los contenidos totales de fenoles se determinaron utilizando el método de Folin-Ciocalteu y los flavonoides se estimaron con el método por Popova y col. [20,21]. Las concentraciones se determinaron por espectrofotometría a 420 nm. La quercetina se utilizó como estándar.

### Microscopía electrónica

A una suspensión de *S. flexneri* conteniendo  $5 \times 10^5$  UFC/mL se le añadió caldo MHB con EA de cáscara de granada a una concentración final de dos veces la CIM. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 12 h. Durante la incubación en los tiempos 0, 6 y 12 h se tomaron alícuotas que se centrifugaron a 12.000 rpm y se descartó el sobrenadante. A continuación, se añadió a los pellets, glutaraldehído 25%, buffer fosfato y para-formaldehído 8% para mantenerlos hasta su posterior procesamiento. Se prepararon controles del EA y el inóculo bacteriano. Los pellets posteriormente se procesaron siguiendo un protocolo previamente descrito con el fin de observar los efectos del EA sobre la bacteria mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). Las observaciones se realizaron en el centro de microscopía electrónica LAMENOA (UNT).

## RESULTADOS

El EA de la cáscara de granada presentó la mayor zona de inhibición (22 mm) a los 25 y 30 min de decocción (Tabla I). La cepa de *S. flexneri* seleccionada presentó resistencia a ampicilina y sensibilidad al resto de los antibióticos ensayados (Tabla II).

### Concentración mínima inhibitoria (CIM)

De las ocho cepas de *S. flexneri* ensayadas, cuatro mostraron una CIM de 0,5 mg/mL y 4 presentaron una CIM de 2 mg/mL (Tabla II). Los valores de CIM para medio líquido y sólido proporcionaron valores comparables para las 8 cepas de *S. flexneri* ensayadas, lo que indica una correlación entre ambas metodologías: CIM de medio sólido y CIM en medio líquido. De las cuatro cepas que presentaron CIM de 0,5 mg/mL, tres demostraron una CBM de 1 mg/mL y la cuarta cepa presentó un valor de 1,1 mg/mL (Tabla III). De las cuatro cepas con una CIM de 2 mg/mL, tres presentaron una CBM de 3 mg/mL y una un valor de 2,5 mg/mL (Tabla III). Los valores están expresados en mg/mL de compuesto soluble de AE. La curva de muerte muestra que después de 4 h el número de células viables (UFC/mL) disminuyó en más de 4 unidades logarítmicas, lo cual indica que el EA de cáscara de granada presentó actividad bactericida frente a *S. flexneri* (Figura 1).

### Análisis fitoquímico y eficiencia de los compuestos activos solubles

A partir de 50 mL de cáscara de granada al 4% sometidos a decocción durante 10 min se obtuvieron 10 mg de compuestos solubles por mL de EA. En ese peso, los contenidos totales de compuestos fenólicos y de flavonoides participaron en un 46% (4,6 mg/mL) y 13% (1,3 mg/mL), respectivamente. La cromatografía de capa fina confirmó la presencia de los compuestos fenólicos en el EA, los cuales serían mayoritariamente flavonoides. Los reactivos cromogénicos utilizados en el revelado de las cromatoplasmas de capa fina no detectaron la presencia de

**Tabla I**

Actividad inhibitoria después de diferentes tratamientos del extracto acuoso (EA) a partir de cáscara de granada frente a *Shigella flexneri*

<b>Tratamiento del extracto acuoso</b>		
<b>Infusión (min)</b>	<b>Decocción (min)</b>	<b>Halos de inhibición (mm)</b>
<b>10</b>	<b>-</b>	<b>16</b>
<b>-</b>	<b>1</b>	<b>18</b>
<b>-</b>	<b>5</b>	<b>19</b>
<b>-</b>	<b>10</b>	<b>20</b>
<b>-</b>	<b>15</b>	<b>20</b>
<b>-</b>	<b>20</b>	<b>21</b>
<b>-</b>	<b>25</b>	<b>22</b>
<b>-</b>	<b>30</b>	<b>22</b>

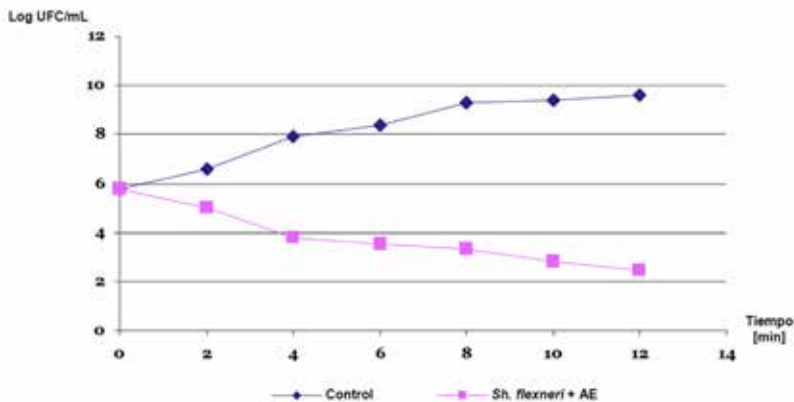
**Tabla II**

Sensibilidad antimicrobiana de *Shigella flexneri* frente a diferentes antibiótico

<b>Antimicrobiano</b>	<b><i>Shigella flexneri</i></b>
Ampicilina (AM 10)	<b>R (6 mm)</b>
Amp + Sulbactama (SAM 10/10)	<b>S (15 mm)</b>
Azitromicina (AZM 15)	<b>S (17mm)</b>
Cefalotina (CEF 30)	<b>S (25 mm)</b>
Cefoxitina (FOX 30)	<b>S (23 mm)</b>
Ceftazidima (CAZ 30)	<b>S (33 mm)</b>
Furazolidona (F 300)	<b>S (25 mm)</b>
Norfloxacin (NOR 10)	<b>S (23 mm)</b>
Cáscara de Granada	<b>20 mm</b>

S: Sensible

R: Resistente



**Figura 1.** Efecto bactericida de cáscara de granada frente a *Shigella flexneri*. Curva de muerte

**Tabla III**

Valores de CIM del EA de cáscara de granada alcanzados frente a *Shigella flexneri* en medio sólido y líquido. Los valores se expresan en mg de compuesto soluble por mL de EA

Cepa	Concentración (mg/mL)												
	5	3	2,5	2	1,7	1,4	1,3	1,1	1	0,5	0,3	0,25	0,2
<i>Sh. flexneri</i> A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Sh. flexneri</i> F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Sh. flexneri</i> G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Sh. flexneri</i> H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Sh. flexneri</i> B	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sh. flexneri</i> C	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sh. flexneri</i> D	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sh. flexneri</i> E	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

\* Los casilleros sombreados en cada fila indican la CIM alcanzada para cada cepa ensayada

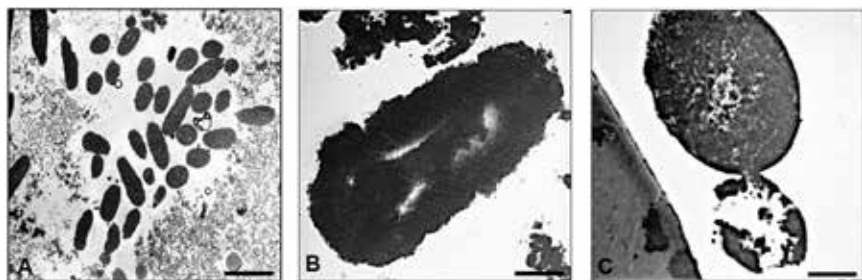
**Tabla IV**

Valores de CBM del EA de cáscara de granada alcanzados frente a *Shigella* spp. Los valores están expresados en mg de compuesto soluble por mL de EA

Cepa	Concentración (mg/mL)												
	5	3	2,5	2	1,7	1,4	1,3	1,1*	1	0,5	0,3	0,25	0,2
<i>Sh. flexneri</i> A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Sh. flexneri</i> F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Sh. flexneri</i> G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Sh. flexneri</i> H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Sh. flexneri</i> B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Sh. flexneri</i> C	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sh. flexneri</i> D	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sh. flexneri</i> E	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sh. flexneri</i> E	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

\* Los casilleros sombreados en cada fila indican la CBM alcanzada para cada cepa ensayada





**Figura 2.** Imágenes obtenidas mediante MET de células de *Shigella flexneri* (A) en ausencia y (B y C) bajo la exposición a la decocción de cáscara de granada. Barra B y C: 0,25  $\mu\text{m}$

cumarinas y alcaloides (Tabla IV).

### Microscopía electrónica

Las células de *S. flexneri* se observaron mediante MET en muestras control (Figura 2A) y expuestas al EA (Figuras 2B y 2C; Barra: 0,25  $\mu\text{m}$ ). A diferencia de lo observado en los controles, las células bacterianas expuestas a EA presentaron forma piriforme con aspecto mamilado y numerosas protuberancias. También se observa pérdida de la integridad de la pared celular. El desarrollo de una vesícula y la pérdida de material celular son claramente visibles (Figuras 2B y 2C).

### DISCUSIÓN

Publicaciones anteriores indicaban que el fruto de *P. granatum* L. posee actividad antibacteriana lo cual explicaría, al menos en parte, los usos informados para el mismo en medicina popular. Por ejemplo, en la medicina tradicional en Cuba, la granada se utiliza para el tratamiento de disentería, infecciones microbianas, diarrea, helmintiasis y patologías respiratorias [21-24]. La granada se utiliza en Etiopía como una droga ténica porque presenta una toxicidad relativa-

mente baja [25,26]. Sin embargo, la toxicidad de *P. granatum* L. no se investigó intensivamente. Amorin no observó ningún efecto tóxico en ratas tratadas con extractos acuosos de granada similares a los utilizados en la medicina popular [27]. En México, Navarro y col. [28], investigaron la actividad antibacteriana de extractos metanólicos de doce plantas, incluyendo la cáscara de granada. Los extractos se ensayaron frente a *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *Candida albicans* mediante el método de microdilución. Los autores informaron una CIM de 0,62 mg/mL para *S. aureus* y 10 mg/mL para *E. coli* y *P. aeruginosa*. Utilizando el mismo método de ensayo, se evaluó el efecto antibacteriano del extracto metanólico de cáscara de granada [29]. El extracto manifestó actividad frente a *S. enteritidis* (CIM=4 mg/mL) y *L. monocytogenes* (CIM=4 mg/mL) y una reducción de más de 1 unidad logarítmica en el caso de *L. monocytogenes* aislada de alimentos durante el almacenamiento de los mismos a 4°C. Nascimento y col. [30], estudiaron el efecto antimicrobiano del fruto de *P. granatum* L. frente a *S. aureus*

ATCC 6538, *S. choleraesuis* ATCC 10708, *P. aeruginosa* ATCC 15442, *B. subtilis*, *K. pneumoniae*, *Shigella* spp., *Proteus* spp., *P. aeruginosa*, *E. aerogenes*, *E. coli* y *S. aureus* (resistente a los antibióticos). Se encontraron zonas inhibitorias ( $\geq 7$  mm) para *P. aeruginosa* ATCC 15442 y *B. subtilis*. Holetz y col. [31], investigaron la actividad antibacteriana de frutos de *P. granatum* L. y encontraron valores de CIM de 62,5  $\mu\text{g/mL}$  para *S. aureus* ATCC 25923 y más de 1.000  $\mu\text{g/mL}$  para *B. subtilis* ATCC 6623, *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 15442. Alanis y col. [13], estudiaron las propiedades antibacterianas de extractos acuosos y metanólicos de 26 plantas medicinales utilizadas en México para el tratamiento de trastornos gastrointestinales. Se ensayó *P. granatum* L. frente a *E. coli* ATCC 25922, *S. sonnei*, *S. flexneri* y *Salmonella* spp. Los investigadores demostraron que el 64% de las cepas de *Sh. sonnei* fueron inhibidas con un extracto que contenía 8 mg/mL del compuesto activo; mientras que la misma concentración inhibió el 100% de las cepas de *S. flexneri*. Estos resultados coinciden con los nuestros. Mathabe y col. [32] examinaron la actividad antibacteriana de extractos metanólicos, etanólicos, acetónicos y acuosos a partir de la raíz de *P. granatum* L. (100 mg/mL) frente a *S. aureus* ATCC 25923, *S. typhi* ATCC 0232, *V. cholerae*, *E. coli* ATCC 35218, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. sonnei* y *S. boydii*. Los autores determinaron zonas inhibitorias de 12,7 y 30,7 mm para *S. sonnei* y *S. flexneri*, respectivamente y, la CIM del extracto acuoso fue de 0,156 mg/mL para ambas especies. Estos estudios muestran que los extractos acuosos y orgánicos de *P. granatum* L. fueron igualmente activos frente a las bacterias Gram negativas *S. sonnei* y *S. boydii*. Este hecho contrasta con los resultados de otros

científicos que afirmaron que los extractos acuosos mostraron menos actividad frente a las bacterias Gram negativas que los extractos orgánicos [33]. Algunos científicos han atribuido la actividad antimicrobiana a la presencia, en raíces, de taninos solubles en agua [34,35]. Nuestro estudio demuestra que el extracto acuoso de cáscara de granada consistió en un 46% de compuestos fenólicos totales. Galotaninos y elagitaninos novedosos, aislados a partir de la corteza del fruto de *P. granatum* L., son los principales componentes responsables de la acción antimicrobiana de esta especie [36]. Varios estudios han tratado de determinar si la actividad de los flavonoides es bacteriostática o bactericida. Algunos ensayos con flavonoides mostraron una reducción de 1.000 veces o más en el recuento de células viables de MRSA-YK, *S. aureus* NCTC 6571 y MRSA-16, lo que sugiere que los flavonoides tienen actividad bactericida. Sin embargo, se ha demostrado recientemente que algunos flavonoides indujeron la formación de agregados pseudomulticelulares tanto en cepas de *S. aureus* resistentes a los antibióticos como sensibles [37]. Probablemente, los flavonoides no matan las células bacterianas, pero sí inducen la formación de agregados bacterianos y por lo tanto, reducen el número de UFC en los recuentos de células. La observación de células bacterianas mediante MET indica que el extracto acuoso de la cáscara de *P. granatum* L., provoca cambios en la condensación de la matriz citoplasmática, ondulaciones en la membrana plasmática, gran contracción del citoplasma y lisis celular. Los efectos observados confirman la actividad antibacteriana observada para el EA en este trabajo mediante el ensayo de

microdilución.

El presente trabajo estableció que el extracto acuoso obtenido de cáscara de granada (*P.granatum*L.)conteniendo un 46% de compuestos fenólicos presentó actividad antimicrobiana contra *S. flexneri*. Se obtuvieron valores de CIM entre 0,5 y 2 mg/mL y de CBM entre 1 y 3 mg/mL. También se demostró, que el extracto disminuyó el crecimiento bacteriano en 3 unidades logarítmicas después de 4 h de incubación y, los resultados de microscopía electrónica mostraron la pérdida de la integridad de la pared celular y lisis celular. Estos resultados confirman la actividad bactericida del EA obtenido de cáscara de granada frente a *S. flexneri*.

## REFERENCIAS

1. Bennish M, Wojtyniak B. 1991. Mortality due to shigellosis: community and hospital data. *Rev. Infect. Dis.* **113**: S245-S251.
2. Ferreccio C, Prado V, Ojeda A, Cayazo M, Abrego P, Guers L, Levine MM. 1991. Epidemiologic patterns of acute diarrhea and endemic *Shigella* infections in children in a poor periurban setting in Santiago, Chile. *Am. J. Epidemiol.* **134**: 614-627.
3. Prado V, Pidal P, Arellano C, Lagos R, San Martín O, Levine M. 1998. Antimicrobial multiresistance of *Shigella* spp. Strains in a semi-rural community of north Santiago. *Rev. Med. Chile.* **126**: 1464-1471.
4. World Health Organization (WHO). 1996. Scientific working group, resistance to antimicrobial agents. *Bull. World Health Organ.* **71**: 335-336.
5. Suárez ME, Carvajal L, Culasso C, Paredes M. 2000. Resistencia de *Shigella* spp. a los antimicrobianos en Córdoba, Argentina, durante el período 1990-1997. *Pan. Am. J. Public. Health.* **7**: 113-117.
6. Binsztein N, Picandet AM, Notario R, Patrino E, DeLesame, DePetris A et al. 1999. Antimicrobial resistance among species of *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, and *aeromonas* isolated from children with diarrhea in 7 argentinian centers. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **41**: 121-126.
7. Stelling J, Yih WK, Galas M, Kulldorff M, Pichel M, Terragno R et al. 2010. Collaborative Group WHONET-Argentina. Automated use of WHONET and SaTScan to detect outbreaks of *Shigella* spp. using antimicrobial resistance phenotypes. *Epidemiol. Infect.* **138**: 873-83.
8. Wagner H, Bladt S, Zgainsky EM. 1984. Plant drug analysis. In: A thin layer chromatography Atlas. Springer, Berlin. O-acetyl-catechins. *Int. J. Antimicrob. Agents* **24**: 374-380.
9. Fuentes V, Rodríguez M, Poucheaux N, Cabrera L, Lara S. 1985. Estudios en la medicina tradicional en Cuba II. *Rev. Plantas Med.* **5**: 13-40.
10. Aguilar A, Camacho JR, Chino S, Jácquez P, López ME. 1994. Herbario medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Información Etnobotánica. Primera Edición, México, DF.
11. Ergin Murat Altuner. 2011. Investigation of antimicrobial activity of *Punica granatum* L. fruit peel ash used for protection against skin infections as folk remedies especially African. *J. Microbiol. Res.* **5**: 3339-3342.
12. Prashanth D, Asha MK, Amit A. 2001. Antibacterial activity of *Punica granatum*. *Fitoterapia* **72**: 171-173.

13. Alanis AD, Calzada F, Cervantes JA, Torres J, Ceballos GM. 2005. Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *J. Ethnopharmacol.* **100**: 153-157.
14. Casellas JM (h), Casellas JM (p), Espinosa C, Tome G, Pagniez G, Ivanovic S, Laspina F. 2000. Actividad in vitro de la azitromicina frente a 100 cepas de *Shigella* spp. aisladas de niños con diarrea aguda en Argentina y Paraguay, en comparación con otros agentes antibacterianos. *Rev. Panam Infec.* **4** supp.
15. López EL, Prado Jiménez V, O'Rayn Gallardo M, Contrini MM. 2000. *Shigella* and Shiga toxin producing *Escherichia coli* causing bloody diarrhea in Latin America. *Infect. Dis. Clin. N. Amer.* **14**: 41-65.
16. Alonso JR. 1998. Tratado de fitomedicina. Bases clínicas y farmacológicas. ISIS Ediciones SRL. Buenos Aires, Argentina.
17. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, Eds. 1999. Manual of clinical microbiology, Seventh Edition. ASM, Press. Washington, DC. SRL. Buenos Aires, Argentina.
18. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology, Ninth Edition. Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland 21202, USA.
19. Clinical and laboratory standards institute. 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. Seventh Edition CLSI. Document M07-A7. Vol 26 N° 2. Wayne, Pennsylvania, USA.
20. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela Raventos RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* **299**: 152-178.
21. Popova M, Silici S, Kaftanoglu O, Bankova V. 2005. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine* **12**: 221-228.
22. Jiménez CA, Rojas N, López AM. 1979. Biological evaluation of Cuban plants (IV). *Rev. Cubana Med. Trop.* **311**: 29-35.
23. Roig JT. 1974. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. Editorial Ciencia y Técnica. La Habana, Cuba; pp 401-402.
24. Seoane Gallo J. 1984. El folklórico médico de Cuba: provincia de Camaguey. Editorial de Ciencias Sociales. La Habana, Cuba; pp 256, 285, 311, 412, 454, 629, 642.
25. Desta B. 1995. Ethiopian traditional herbal drugs. Part I: studies on the toxicity and therapeutic activity of local taenicidal medications. *J. Ethnopharmacol.* **45**: 27-33.
26. Jurenka JS. 2008. Therapeutics application of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. *Altern. Med. Rev.* **13**: 128-144.
27. Amorin A. 1995. Test of mutagenesis in mice treated with aqueous extracts from *Punica granatum* L. *Rev. Bras. Farm.* **74**: 110-111.
28. Navarro V, Villarreal ML, Rojas G, Lozoya X. 1996. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. *J. Ethnopharmacol.* **53**: 143-147.

29. Al-Zoreky NS. 2009. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *Int. J. Food Microbiol.* **134**: 244–248.
30. Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. *Braz. J. Microbiol.* **31**: 247-256.
31. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, García Cortez DA, Nakamura CV, Dias Filho BP. 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **97**: 1027-1031.
32. Mathabe MC, Nikolova RV, Lall N, Nyazema NZ. 2006. Antibacterial activities of medicinal plants used for the treatment of diarrhea in Limpopo Province, South Africa. *J. Ethnopharmacol.* **105**: 286-293.
33. Shale TL, Stirk WA, Van Staden J. 1999. Screening of medicinal plants used in Lesotho for antibacterial and anti-inflammatory activity. *J. Ethnopharmacol* **67**: 347-354.
34. Lall N., Meyer JJM. 2000. Antibacterial Activity of water and a cetone extracts of roots of *Euclea natalensis*. *J. Ethnopharmacol.* **72**: 313-316.
35. Matu EN, Van Staden J. 2003. Antibacterial and anti-inflammatory activities of some plants used for medicinal purposes in Kenya. *J. Ethnopharmacol.* **87**: 35-41.
36. Cowan MM. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol Rev.* **2**: 564-582.
37. Machado TB, Pinto AV, Pinto MCFR, Leal ICR, Silva MG, Amaral ACF et al. 2003. *In vitro* activity of Brazilian medicinal plants naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **21**: 279-284.